

高植物蛋白饲料中以低分子水解蛋白替代鱼粉对牙鲆生长性能及非特异性免疫的影响

许团辉^{1,2} 高湘萍³ 梁萌青^{1*} 王新星¹ 郑珂珂¹ 常青¹ 吴立新²

(¹ 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 266071)

(² 大连海洋大学生命科学与技术学院, 116023)

(³ 青岛海洋地质研究所, 266071)

摘要 以初始平均体重为 38.80 ± 0.11 g 的牙鲆 *Paralichthys olivaceus* 为实验对象, 研究在高植物蛋白饲料中用低分子水解蛋白替代鱼粉对牙鲆生长、饲料利用及非特异性免疫指标的影响。分别以不同水解鱼蛋白替代总蛋白的 0(FM₁ 为负对照, 含豆粕 55%、鱼粉 19%)、0(FM₂ 为正对照, 含豆粕 45%、鱼粉 25%)、11%(FPH₁₁)、16%(FPH₁₆)、21%(FPH₂₁)、26%(FPH₂₆) 制得 7 组等氮等能饲料。实验结果表明, 用低分子水解鱼蛋白替代总蛋白 11% 组的特定生长率显著高于负对照组 ($P < 0.05$), 且与正对照组无显著性差异 ($P > 0.05$); FPH₁₁、FPH₁₆、FPH₂₁ 和 FPH₂₆ 组的摄食率显著高于负对照组 ($P < 0.05$); 替代总蛋白 11% 组的蛋白沉积率显著高于负对照组 ($P < 0.05$), 与正对照组相等 ($P > 0.05$); 替代水解蛋白各组的蛋白质消化率均显著性高于负对照组 ($P < 0.05$), 与正对照组无显著性差异 ($P > 0.05$); 替代水解蛋白各组的 SOD 活力都显著高于负对照组 ($P < 0.05$), 且替代总蛋白 11% 组显著性高于正对照组; FPH₆、FPH₁₁、FPH₁₆ 组的总抗氧化能力显著高于负对照组但显著低于正对照组 ($P < 0.05$)。

关键词 水解蛋白 牙鲆 生长 饲料利用 非特异性免疫

中图分类号 S963.16 文献识别码 A 文章编号 1000-7075(2012)03-0060-10

Effects of small size-fractionated fish protein hydrolysate substitution of fish meal in high plant protein diets on the growth performance and non-specific immunity of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*

XU Tuan-hui^{1,2} GAO Xiang-ping³ LIANG Meng-qing^{1*} WANG Xin-xing¹
ZHENG Ke-ke¹ CHANG Qing¹ WU Li-xin²

(¹ Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(² College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, 116023)

(³ Qingdao Institute of Marine Geology, 266071)

ABSTRACT A 63-day feeding experiment was conducted to evaluate the effects of fish pro-

国家自然科学基金项目(30771660)、国际科技合作专项(2008DFA31720)和中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费专项资金项目共同资助

* 通讯作者。E-mail: liangmq@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85822914

收稿日期: 2011-05-15; 接受日期: 2011-05-27

作者简介: 许团辉(1983-), 男, 硕士研究生, 主要从事水产动物营养与饲料研究。E-mail: thx001@163.com

tein hydrolysate as feed ingredient in high plant-protein diets on growth performance and non-specific immunity for Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Fish protein hydrolysates respectively replaced 0 (FM₁, negative control, containing 55% soybean meal and 19% fish meal), 0 (FM₂, positive control, containing 45% soybean meal and 25% fish meal), 6% (FPH₆), 11% (FPH₁₁), 16% (FPH₁₆), 21% (FPH₂₁), and 26% (FPH₂₆) of the total protein. The results showed that specific growth rate and protein retention of fish fed with FPH₁₁ was significantly higher than FM₁ ($P < 0.05$), but was not significantly different from FM₂ ($P > 0.05$). For protein digestibility, all the hydrolyzed protein diets were significantly higher than FM₁ ($P < 0.05$), but was not significantly different from FM₂ ($P > 0.05$). Feeding rates of FPH₁₁, FPH₁₆, FPH₂₁ and FPH₂₆ were significantly higher than FM₂ ($P < 0.05$). The relative activities of acid phosphatase (ACP) in fish fed with FM₁ was significantly lower than FPH₂₆ ($P < 0.05$). SOD relative activities in all the hydrolyzed protein diet were higher than FM₁ ($P < 0.05$), and SOD relative activities in FPH₁₁ was significantly higher than FM₂ ($P < 0.05$). Total antioxidative capacity of FPH₆, FPH₁₁ and FPH₁₆ were significantly higher than FM₁ and lower than FM₂ ($P < 0.05$).

KEY WORDS Fish protein hydrolysate *Paralichthys olivaceus* Growth
Feed utilization Non-specific immunity

随着养殖业的不断发展,对鱼粉需求量剧增,而世界鱼粉产量又趋于稳定,这就造成鱼粉的短缺和价格不断上涨,鱼粉已经成为影响饲料业发展的重要因素。植物蛋白具有来源广泛、产量大、价格相对较低等优点,因此提高植物蛋白的用量、减少鱼粉的使用量具有可行性和重要意义,特别是对蛋白需求很高的海水鱼类。然而,添加过量的植物蛋白会严重影响鱼类的摄食、生长、消化和饲料利用(Kaushik *et al.* 1995; Clarke *et al.* 2000; Francis *et al.* 2001)。

水解鱼蛋白是一种富含寡肽的蛋白制品,添加一定量的水解鱼蛋白对鱼类特别是仔幼鱼生长、发育和饲料利用有着显著的促进作用(Anggawati *et al.* 1990; Berge *et al.* 1996; Carvalhoa *et al.* 2004)。Aksnes 等(2006a)对水解蛋白经过超滤后,分离出3种高低不同分子量的水解蛋白替代饲料中的鱼粉投喂鳕鱼,发现低分子量水解蛋白组分是维持鳕鱼等肉食性鱼在饲喂高植物蛋白饲料条件下正常生长和饲料转化效率所必不可少的成分。

我国鱼类水产加工行业每年约产生2000万余t的鱼头、鱼皮、鱼鳍、鱼尾、鱼骨及其残留鱼肉等有机下脚料,如果不进行有效处理,不仅会污染环境,而且浪费大量的营养物质(江新业 2008)。水产品下脚料含有较高的蛋白,用作制取水解蛋白的原料不仅变废为宝,而且提高了附加值,可获得良好的经济和社会效益。

牙鲆 *Paralichthys olivaceus* 是冷温性底栖的肉食性海水鱼类,对饲料中蛋白质的需求量和质量有较高的要求,是我国沿海重要经济鱼类和海水增养殖鱼类。本实验在高植物蛋白饲料中用鳕鱼下脚料制取低分子水解蛋白替代鱼粉饲喂牙鲆,研究用不同水平的低分子水解蛋白替代鱼粉对牙鲆生长性能、饲料利用、非特异性免疫等的影响,为科学合理地应用水解蛋白及提高植物蛋白质利用率提供依据。

1 材料与方法

1.1 水解鱼蛋白的制备

采用复合酶解技术,利用鳕鱼加工下脚料碎鱼肉制备水解鱼蛋白。在50~55℃条件下,碱性水解蛋白酶和复合风味蛋白酶联合水解太平洋鳕鱼肉,酶解液经过4000 r/min得到的滤液用Pellicon2超滤膜堆装置进

行超滤,过滤得到低分子水解蛋白溶液,经旋转蒸发浓缩、真空冷冻干燥得干品。制备的低分子水解鱼蛋白送至挪威国家营养与食品研究所进行测定,分子量分布如表1所示。

1.2 实验饲料

以鱼粉、豆粕为主要蛋白源,以鱼油为脂肪源,配制等氮等能的7种配合饲料,饲料配方及营养组成见表2。分别

以不同水解鱼蛋白替代总蛋白的0(FM₁为负对照,含豆粕55%,鱼粉19%)、0(FM₂为正对照,含豆粕45%,鱼粉25%)、6%(FPH₆)、11%(FPH₁₁)、16%(FPH₁₆)、21%(FPH₂₁)和26%(FPH₂₆)。实验饲料原料均粉碎过80目充分混匀后,用2%的明胶做粘合剂,用饲料颗粒机加工制成直径为3mm的颗粒饲料,60℃鼓风干燥后保存在-20℃备用。

表1 制备的水解鱼蛋白分子量分布(%)

Table 1 Molecular weight of FPH(%)

分子量 Molecular weight(Da)	水解蛋白 Fish protein hydrolysate
>20 000	<0.1
10 000~20 000	<0.1
5 000~10 000	1.6
1 000~5 000	5.5
100~1 000	66.4
<100	26.5

表2 实验饲料配方和营养组成(%干物质)

Table 2 Formulation and proximate chemical composition of experimental diets (% in dry matter)

成分 Ingredient(%)	饲料组 Diet						
	FM ₁	FPH ₆	FPH ₁₁	FPH ₁₆	FPH ₂₁	FPH ₂₆	FM ₂
鱼粉 Fish meal	19.0	16.0	13.0	10.0	7.0	4.0	25.0
水解鱼蛋白 Fish protein hydrolysate	0	2.3	4.5	6.7	9.0	11.0	0
豆粕 Soybean meal	55.0	55.0	55.0	55.0	55.0	55.0	45.0
高筋粉 High-gluten wheat flour	13.6	14.0	14.6	15.1	15.6	16.3	18.0
磷脂 Phospholipid	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
鱼油 Fish oil	5.4	5.7	5.9	6.2	6.4	6.7	5.0
维生素混合物 Vitamin premix ¹	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
矿物质混合物 Mineral premix ²	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
三氧化二铬 Cr ₂ O ₃	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
氯化胆碱 Choline chloride	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Vc	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
磷酸二氢钙 Ca(H ₂ PO ₄) ₂	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
营养成分 Proximate composition(%)							
水分 Moisture	7.45	8.01	7.88	7.63	7.74	7.89	7.35
粗蛋白 Crude protein	42.06	41.53	41.00	40.88	40.63	40.44	41.88
粗脂肪 Crude lipid	13.58	13.31	12.79	12.69	12.69	12.84	12.35
灰分 Ash	9.07	8.25	8.52	8.37	8.12	7.24	9.14
能量 Gross energy (kJ/g)	18.95	18.81	18.88	18.89	18.88	18.95	18.88

注:1) 维生素混合物(mg/kg or g/kg 饲料): 硫胺素,25 mg;核黄素,45 mg;盐酸吡哆醇,20 mg;维生素 B₁₂,0.1 mg;维生素 K₃,10 mg;肌醇,800 mg;泛酸,60 mg;烟酸,200 mg;叶酸,20 mg;生物素,1.20 mg;维生素 A,32 mg;维生素 D,5 mg;维生素 E,120 mg;次粉 18.67 g

2) 无机盐混合物(mg/kg or g/kg 饲料): 氟化钠,2 mg;碘化钾,0.8 mg;氯化钴,50 mg;硫酸铜,10 mg;硫酸铁,80 mg;硫酸锌,50 mg;硫酸镁,1 200 mg;磷酸二氢钙,3 000 mg;氯化钠,100 mg;沸石粉,15.51 g

Notes:1) Vitamin premix (mg/kg or g/kg diet): Thiamine, 25 mg; Riboflavin, 45 mg; Pyridoxine, 20 mg; Vitamin B₁₂, 0.1 mg; Menadione, 10 mg; Inositol, 800 mg; Pantothenate, 60 mg; Ocopherol acetate, 200 mg; Folic acid, 20 mg; Biotin, 1.2 mg; Vitamin A, 32 mg; Vitamin D, 5 mg; Vitamin E, 120 mg; Wheat flour, 18.67 g

2) Mineral premix (mg/kg or g/kg diet): NaF, 2mg; KI, 0.8 mg; CoCl₂ · 6H₂O, 50 mg; CuSO₄ · 5H₂O, 10 mg; FeSO₄ · 7H₂O, 80 g; ZnSO₄ · 7H₂O, 50 mg; MnSO₄ · 4H₂O,1200 mg; Ca(H₂PO₄)₂ · H₂O, 3 g; NaCl, 100 g; Mordenzeo, 15.51 g

1.3 实验鱼和饲养管理

实验用牙鲆购自山东烟台天源水产有限公司。生长实验在室内流水养殖系统中进行,21个圆形玻璃缸(体积120 L),水源为深井过滤曝气的海水,进水流速约为10 L/min,连续充气。水温为 14 ± 0.5 °C,盐度为28~30,pH值为 7.8 ± 0.1 ,溶氧高于7 mg/L,氨氮低于0.5 mg/L。

实验设7个组,每组3个重复。实验用鱼暂养7d,随机选取体质健康、规格均匀的实验鱼,称重后随机放入各缸,实验鱼初始平均体重为 38.80 ± 0.11 g,每缸15尾。实验期间,每天两次(7:20和16:00)投喂实验鱼,投喂实验饲料至表观饱食。生长实验持续63 d。

1.4 样品收集

分鱼前随机取9尾鱼称重,保存于 -20 °C以供后续分析鱼体生化成分。实验结束时,将鱼饥饿24 h,每缸鱼称量终末总重,同时每缸取3尾实验鱼称重,保存于 -20 °C用于鱼体成分分析。从每个水族缸随机取6尾鱼,尾静脉取血。将所抽取的全血 4 °C放置2 h后,于离心机中 $3\ 500$ r/min、 4 °C离心15 min,取上清液, -20 °C保存。

1.5 生化分析

饲料和全鱼样品在 105 °C烘干至恒重,通过失重法测定干物质含量,然后进行生化测定。粗蛋白采用凯氏定氮法;粗脂肪采用索氏抽提法,以石油醚为抽提液进行测定;灰分在马福炉中 550 °C燃烧3 h,失重法测定;饲料和粪便样品中的 Cr_2O_3 通过ICP原子吸收光谱法测定。

1.6 血清酸性磷酸酶、碱性磷酸酶、超氧化物歧化酶、溶菌酶、总抗氧化能力酶活力测定

1.6.1 血清酸性磷酸酶

酸性磷酸酶(ACP)的测定采用南京建成生物工程研究所酸性磷酸酶试剂盒测定方法进行测定。定义:100 ml血清在 37 °C与基质作用30 min产生1 mg 酚为1个酸性磷酸酶活力单位。

测定原理:酸性磷酸酶分解磷酸苯二钠,产生游离酚和磷酸,酚在碱性溶液中与4-氨基安替吡啉作用经铁氰化钾氧化生成红色醌衍生物,根据红色深浅可以测定酶活力的高低。

1.6.2 碱性磷酸酶

碱性磷酸酶(AKP)的测定采用南京建成生物工程研究所碱性磷酸酶试剂盒测定方法进行测定。定义:100 ml血清在 37 °C与基质作用30 min产生1 mg 酚为1个金氏单位。

测定原理:碱性磷酸酶分解磷酸苯二钠,产生游离酚和磷酸,酚在碱性溶液中与4-氨基安替吡啉作用经铁氰化钾氧化生成红色醌衍生物,根据红色深浅可以测定酶活力的高低。

1.6.3 超氧化物歧化酶

超氧化物歧化酶(SOD)的测定采用南京建成生物工程研究所试剂盒测定方法进行测定。定义:每毫升反应液中SOD抑制率达50%时所对应的SOD量为1个SOD活力单位。

测定原理:通过黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶反应系统产生称为超氧阴离子自由基 O_2^- ,后者氧化羟胺形成亚硝酸盐,在显色剂作用下呈现紫红色,用可见分光光度计测其吸光度。

1.6.4 溶菌酶

溶菌酶的测定采用南京建成生物工程研究所试剂盒测定方法进行测定。用空白对照法测定。定义:在 37 °C时,15 min待测液透明度变化为标准液透明度变化的 $2/5$ 为1个活力单位。

测定原理:一定浓度的混浊菌液中,由于溶菌酶能水解细菌细胞壁上肽聚糖使细菌裂解而浓度降低,透光度增强,故可以根据透光度变化来测定溶菌酶的含量。

1.6.5 总抗氧化能力

总抗氧化能力(T-AOC)测定采用南京建成生物工程研究所试剂盒测定方法进行测定。定义:在 37 °C时,

每分钟每毫升血清使反应体系的吸光度每增加 0.01 时,为 1 个总抗氧化能力单位。

测定原理:机体中有许多抗氧化物质,能使三价铁离子还原成二价铁离子,后者可与菲啉类物质形成稳固的络合物,通过比色可测出其抗氧化能力的高低。

1.7 计算及统计分析方法

成活率(%)=实验结束时鱼的尾数/实验开始时鱼的尾数×100

特定生长率(%/d)=100×[ln(终末体重)-ln(初始体重)]/实验天数

摄食率(%体重/d)=100×总干物质摄食量/[实验天数×(初始体重+终末体重)/2]

蛋白质的表观消化率(%)=[1-(饲料中 Cr₂O₃%×粪便中粗蛋白%)/(粪便中 Cr₂O₃%×饲料中粗蛋白%)]×100

饲料系数(FCR)=(投饵量-残饵量)/(终末体重-初始体重)

蛋白质沉积率(%)=鱼体蛋白质贮存量/蛋白摄入量×100

蛋白质效率比(PER,%)=鱼体平均体增重/蛋白质摄入量×100

肝体比(HSI,%)=肝脏湿重/鱼体湿重×100

结果表示为平均值±标准误差。采用 SPSS 11.5 统计软件进行分析,实验结果经单因素方差分析(One-way ANOVA)后,若差异显著进行邓肯多重比较(Duncan's multiple range tests),显著水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 饲料以低分子水解鱼蛋白替代鱼粉对牙鲆生长的影响

在高植物蛋白饲料中用低分子水解鱼蛋白替代鱼粉对牙鲆生长的影响见表 3。低分子水解鱼蛋白替代总蛋白 11%组投喂牙鲆生长效果最好,特定生长率显著高于鱼粉含量较低负对照组($P < 0.05$),且与鱼粉含量较高的正对照组无显著性差异($P > 0.05$);替代总蛋白 16%组和 21%组的特定生长率与负对照组和正对照组均无显著性差异($P > 0.05$);替代总蛋白 6%组和替代总蛋白 26%组的特定生长率与负对照无显著性差异($P > 0.05$),但显著低于正对照组($P < 0.05$)。特定生长率有随着水解蛋白添加量增加先升高而后又降低的趋势。饲料中替代水解鱼蛋白对牙鲆成活率无显著性影响($P > 0.05$)。

表 3 饲料中低分子水解鱼蛋白替代鱼粉对牙鲆生长的影响(平均值±标准差)

Table 3 The effects of fish protein hydrolysate on growth performance of flounder *P. olivaceus* (Mean±S.E.)

生长 Growth	组别 Group						
	FM ₁	FPH ₆	FPH ₁₁	FPH ₁₆	FPH ₂₁	FPH ₂₆	FM ₂
初重 Initial body weight(g)	38.87±0.10	38.87±0.16	38.76±0.07	38.82±0.08	38.89±0.02	38.77±0.13	38.80±0.07
末重 Final body weight(g)	53.91±0.62 ^a	54.65±2.32 ^a	60.59±3.08 ^{bc}	58.36±3.06 ^{abc}	56.67±2.92 ^{abc}	55.78±0.69 ^{ab}	61.73±3.70 ^c
成活率 Survival rate(%)	100±0	97.78±3.85	93.33±6.67	97.78±3.85	95.56±3.85	100±0	93.33±0
特定生长率(%/d) Specific growth rate	0.51±0.02 ^a	0.53±0.06 ^a	0.69±0.08 ^{bc}	0.64±0.09 ^{abc}	0.58±0.08 ^{abc}	0.56±0.02 ^{ab}	0.72±0.09 ^c

注:同一行数据中具有不同字母的表示差异显著($P < 0.05$)

Note: values with different superscripts in the same row are significantly different ($P < 0.05$)

2.2 饲料以低分子水解鱼蛋白替代鱼粉对牙鲆饲料利用的影响

饲料中用低分子水解鱼蛋白替代鱼粉对牙鲆饲料利用的影响见表 4。摄食率所有替代水解蛋白组都高于含鱼粉量较低的负对照组,而且 FPH₁₁、FPH₁₆、FPH₂₁、FPH₂₆ 组显著高于负对照组($P < 0.05$)与正对照组无

显著性差异($P>0.05$)。

替代总蛋白 11% 组的蛋白沉积率显著高于负对照组($P<0.05$),与正对照组相等($P>0.05$);FPH₆、FPH₁₆、FPH₂₁ 组的蛋白沉积率与负对照组无显著性差异($P<0.05$),低于 FPH₁₁ 组及正对照组($P<0.05$)。蛋白沉积率有先随着水解蛋白添加量增加而升高然后又降低的趋势。

替代总蛋白 11% 组和 21% 组的蛋白质效率比显著高于替代总蛋白 26% 组($P<0.05$),与两对照组无显著性差异($P>0.05$)。

替代总蛋白 26% 组饲料系数显著高于负对照组 FM₁、FPH₁₁、FPH₁₆、FPH₂₁ 组($P<0.05$),与 FPH₆ 组没有显著性差异($P>0.05$);FPH₆、FPH₁₆、FPH₂₁、FPH₂₆ 组均显著高于正对照组($P<0.05$),与负对照组没有显著性差异($P>0.05$)。

替代水解蛋白各组的蛋白质消化率均显著性高于低鱼粉负对照组($P<0.05$),与高鱼粉正对照组无显著性差异($P>0.05$)。

各处理组肝体比无显著性差异($P>0.05$)。

表 4 低分子水解鱼蛋白替代鱼粉对牙鲆饲料利用的影响(平均值±标准差)

Table 4 The effects of fish protein hydrolysate on feed utilization of flounder *P. olivaceus* (Mean ± S. E.)

饲料利用 Feed utilization	组别 Treatment						
	FM ₁	FPH ₆	FPH ₁₁	FPH ₁₆	FPH ₂₁	FPH ₂₆	FM ₂
摄食率(%) Feeding rate	0.80±0.04 ^a	0.95±0.04 ^{ab}	1.10±0.06 ^{bc}	1.09±0.08 ^{bc}	0.96±0.05 ^b	1.14±0.10 ^c	0.99±0.15 ^{bc}
蛋白沉积率(%) Protein retention	0.21±0.017 ^b	0.20±0.03 ^{ab}	0.26±0.02 ^c	0.20±0.01 ^{ab}	0.21±0.02 ^b	0.17±0.01 ^a	0.26±0.02 ^c
蛋白质效率比(%) PER	150.34±8.88 ^{bc}	133.48±10.00 ^{ab}	152.38±21.97 ^{bc}	140.86±10.36 ^{ab}	147.91±19.33 ^{bc}	122.76±6.51 ^a	171.29±5.58 ^c
饲料系数 Feed coefficient	1.55±0.09 ^{ab}	1.81±0.14 ^{bc}	1.62±0.22 ^{ab}	1.74±0.13 ^b	1.68±0.22 ^b	2.01±0.10 ^c	1.39±0.05 ^a
蛋白质消化率(%) Crude protein digestibility	87.87±0.27 ^a	90.90±1.08 ^c	90.34±0.45 ^{bc}	90.49±0.37 ^{bc}	89.50±0.26 ^b	90.46±0.73 ^{bc}	90.50±0.19 ^{bc}
肝体比(%) <i>HSI</i>	1.62±0.16	1.61±0.13	1.91±0.14	1.97±0.47	1.59±0.26	1.80±0.18	1.96±0.20

注:同一行数据中具有不同字母的表示差异显著($P<0.05$)

Note: values with different superscripts in the same row are significantly different ($P<0.05$)

2.3 水解蛋白对牙鲆血清酸性磷酸酶、碱性磷酸酶、超氧化物歧化酶、溶菌酶、总抗氧化能力酶活力的影响

水解蛋白对牙鲆血清酸性磷酸酶、碱性磷酸酶、超氧化物歧化酶、溶菌酶、总抗氧化能力酶活力的影响如表 5 所示。替代总蛋白 26% 组血清酸性磷酸酶(ACP)活性,显著高于低鱼粉负对照组($P<0.05$),与 FPH₆、FPH₁₁、FPH₁₆、FM₂ 组无显著性差异($P>0.05$);碱性磷酸酶(AKP)活性各处理组没有显著差异($P>0.05$)。

替代水解蛋白各组的超氧化物歧化酶活力都显著高于负对照组($P<0.05$),且替代总蛋白 11% 组显著性高于正对照组、FPH₂₁、FPH₂₆ 组($P<0.05$),与 FPH₆、FPH₁₆ 组无显著性差异($P>0.05$);对于溶菌酶活性,各处理组没有显著性差异($P>0.05$);FPH₆、FPH₁₁、FPH₁₆ 组总抗氧化能力显著高于低鱼粉负对照组 FPH₂₁、FPH₂₆ 组($P<0.05$),但显著低于正对照组($P<0.05$),总抗氧化能力随着水解蛋白替代量的增加呈现先增加后下降的趋势。

2.4 水解蛋白对鱼体化学成分的影响

如表 6 所示,63d 的生长实验结束后,FPH₁₁ 组的鱼体水分含量显著低于低鱼粉负对照组($P<0.05$),与高鱼粉正对照组无显著性差异($P>0.05$);各处理组的鱼体蛋白含量没有显著性差异($P>0.05$);替代总蛋白 11% 和 26% 组的鱼体脂肪含量显著高于负对照组($P<0.05$),与正对照组无显著性差异($P>0.05$),各替代水

解鱼蛋白组脂肪含量无显著性差异($P>0.05$);水解蛋白各组的灰分与负对照组没有显著性差异($P>0.05$), FPH₂₁组显著高于正对照组。

表5 水解鱼蛋白对牙鲆酸性磷酸酶、碱性磷酸酶、超氧化物歧化酶、溶菌酶活力及总抗氧化能力活力的影响(平均值±标准差)

Table 5 The effects of fish protein hydrolysate on the ACP, AKP, SOD, LYZ, T-AOC relative activities in flounder *P. olivaceus* (Mean ± S. E.)

酶活力 Serum enzyme relative activity	组别 Treatment						
	FM ₁	FPH ₆	FPH ₁₁	FPH ₁₆	FPH ₂₁	FPH ₂₆	FM ₂
酸性磷酸酶(U/100ml) Acid phosphatase	4.77±0.61 ^a	5.36±0.68 ^{ab}	5.86±0.74 ^{ab}	5.97±0.75 ^{ab}	5.04±0.8 ^{ab}	6.46±1.09 ^b	5.14±0.07 ^{ab}
碱性磷酸酶(U/100ml) Alkaline phosphatase	4.94±0.89	8.61±0.74	8.18±3.99	6.93±1.28	7.01±1.72	6.84±1.92	6.16±1.10
超氧化物歧化酶(U/ml) Superoxide dismutase	108.85±5.16 ^a	124.81±4.39 ^{bc}	138.24±8.01 ^c	125.45±11.97 ^{bc}	124.05±7.92 ^b	122.02±4.76 ^b	122.66±6.27 ^b
溶菌酶(μg/ml) Lysozyme	38.91±0.32 ^{ab}	30.22±2.57 ^a	43.73±10.29 ^b	45.87±9.96 ^b	38.80±9.97 ^{ab}	37.08±2.60 ^{ab}	38.16±3.77 ^{ab}
总抗氧化能力(U/ml) Total antioxidative capacity	4.04±1.83 ^a	8.26±0.25 ^b	9.44±0.32 ^b	8.69±0.80 ^b	5.96±2.09 ^a	4.13±0.06 ^a	13.32±1.33 ^c

注:同一行数据中具有不同字母的表示差异显著($P<0.05$)

Note: values with different superscripts in the same row are significantly different ($P<0.05$)

表6 水解鱼蛋白对牙鲆鱼体化学组成的影响(平均值±标准差)

Table 6 The effects of fish protein hydrolysate on proximate body compositions of flounder *P. olivaceus* (Mean±S. E.)

体成分 Body composition	组别 Treatment						
	FM ₁	FPH ₆	FPH ₁₁	FPH ₁₆	FPH ₂₁	FPH ₂₆	FM ₂
水分 Moisture(%)	75.35±0.74 ^b	74.59±0.45 ^b	73.90±1.05 ^a	74.74±0.31 ^b	75.85±1.22 ^b	75.40±1.07 ^b	73.91±0.80 ^a
粗蛋白 Crude protein(%)	57.81±1.08	59.33±2.64	59.56±1.87	57.19±0.28	58.67±1.41	57.00±0.76	58.38±0.50
粗脂肪 Crude lipid(%)	15.78±0.53 ^a	17.29±0.58 ^{ab}	19.05±1.38 ^{bc}	17.54±1.61 ^{ab}	17.44±0.77 ^{ab}	18.20±1.05 ^{bc}	19.59±0.64 ^c
灰分 Ash(%)	13.40±0.98 ^{ab}	12.54±0.90 ^{ab}	12.77±0.45 ^{ab}	13.16±0.44 ^{ab}	13.96±1.47 ^b	12.60±1.35 ^{ab}	12.05±0.58 ^a

注:同一行数据中具有不同字母的表示差异显著($P<0.05$)

Note: values with different superscripts in the same row are significantly different ($P<0.05$)

3 讨论

3.1 水解蛋白对牙鲆生长性能及饲料利用的影响

水解蛋白是一种富含低分子肽的蛋白制品。研究表明,水解蛋白里的低分子肽在动物机体内具有吸收速度快、消化率和吸收率高等优势(Newey *et al.* 1960; Teshima *et al.* 1993; 陈勇等 1999; 王佳丽等 2003),应用于养殖中可以提高水产动物类的生长及饲料利用效率(陈勇等 1999),具有提高水产动物成活率、增重率,促进鱼类生长等优点(Teshima *et al.* 1993)。本研究使用的水解蛋白分子量主要在100~1000Da之间(占66.4%),分子量小于1000Da的肽被称为寡肽(王建峰等 2006)。本研究的结果表明,用低分子水解鱼蛋白替代总蛋白11%组投喂牙鲆生长效果最好,特定生长率、蛋白沉积率显著高于鱼粉含量较低负对照组($P<0.05$),与鱼粉含量较高的正对照组无显著性差异($P>0.05$),FPH₁₁组的蛋白质效率与正负对照组均无显著性差异(表3,表4)。负对照组的鱼粉含量19%,豆粕55%,正对照组的鱼粉含量为25%,豆粕含量为45%,而FPH₁₁组的鱼粉含量仅为13%,相似的生长结果,鱼粉用量相差12%,这充分显示了低分子水解

蛋白替代鱼粉的优越性。Berge等(1996)认为,适度的鱼蛋白酶解产物(3.3%)可较好促进大西洋鲑幼鱼的生长。Anggawati等(1990)报道,在对虾饲料中用3%鱼水解蛋白替代鱼粉就可以达到显著促进生长的效果。雷光高等(2008)在牙鲆饲料中添加了0.5%和1.0%两种不同比例的寡肽产品,得出试验组的生长效果均高于对照组,且添加1.0%的寡肽显著提高了牙鲆幼鱼的生长。李清等(2005)在对鲤鱼基础饲料中添加1%的寡聚肽后,研究发现可提高成鲤肌肉蛋白质的沉积率。王家林等(2006)报道了在对饲料中添加一定比例的蛋白寡聚肽替代饲料中的蛋白质饲喂海水鲈鱼后,蛋白沉积率表现出增长趋势。Espe等(1999)报道15%的水解鱼蛋白替代鱼粉可以显著改善大西洋鲑幼鱼和成鱼的生长,并通过对血清游离氨基酸和肌肉示踪赖氨酸的检测,推测生长的改善是由于水解鱼蛋白改善了实验鱼的蛋白代谢率和蛋白沉积率。前人研究的最佳添加量多在1%~3.3%之间,本研究替代总蛋白11%即添加水解蛋白为4.5%时获得最佳生长效果,与前人的研究结果不同,这可能与水解蛋白的分子量有关。本研究用的水解蛋白是经过超滤的分子量小于100~1000Da占64%的低分子水解蛋白。Aksnes等(2006a)用不同分子量的水解蛋白在高植物蛋白饲料中替代鱼粉投喂鳕鱼,研究认为低分子水解蛋白在高植物蛋白饲料中对鳕鱼的最佳生长具有不可替代的作用。Aksnes等(2006b)在虹鳟饲料(植物蛋白分别占总蛋白的74%、58%)中,分别添加占总蛋白16%、32%的水解蛋白和筛除小于1000Da分子量组分的水解蛋白,结果缺乏低分子量蛋白组分实验组虹鳟的蛋白效率、蛋白沉积率、蛋白质生物效价均降低了10%,虹鳟的特定生长率、热生长系数、饲料效率也分别下降了33%~36%、25%~29%和14%~17%,与本实验结果相似。

本研究中特定生长率先随着水解蛋白添加量的增加而提高然后又降低,替代总蛋白11%组的特定生长率最高,而后随着替代量的升高有降低的趋势,这与前人研究的结果基本相同。多数关于饲料中水解鱼蛋白的研究发现,在一定范围内添加水解鱼蛋白可以提高鱼类的生长性能和饲料利用,但超过这一范围会带来负面影响(于辉等2004;甘晖等2005)。Carvalho等(2004)研究表明,酶解酪蛋白可促进鲤鱼幼鱼生长,但高含量反而对生长产生负面影响,同样Cahu等(1999)在对鲈幼体研究中也得到同样的结论。刘峰等(2006)的研究结果表明,以适宜水平的鱼肉水解蛋白替代鱼粉蛋白,将显著提高大黄鱼稚鱼存活率,可能有利于其生长,而过高的替代水平则起到阻碍作用。Adriana等(2003)认为,南美白对虾消化道中蛋白酶活性受胰腺中蛋白酶基因表达量调节,高浓度寡肽反而会抑制虾类生产性能。

由于低分子水解蛋白生产过程会产生游离氨基酸、诱食性寡肽,胺类等化学物质,这些都是很好的鱼类诱食剂,可以改善饲料的适口性(王碧莲等2001;Takii *et al.* 1986;冯健等2004)。本研究FPH₁₁、FPH₁₆、FPH₂₁、FPH₂₆组摄食率显著高于负对照组($P < 0.05$)且与正对照组无显著性差异($P > 0.05$)。这与Aksnes等(2006a)得出在高植物蛋白饲料中添加水解蛋白替代鱼粉对鳕鱼摄食率无显著性影响不同。

本研究结果表明,替代水解蛋白各组的饲料系数均高于两对照组,替代总蛋白26%组显著高于负对照组($P < 0.05$),FPH₆、FPH₁₆、FPH₂₁、FPH₂₆组均显著高于正对照组($P < 0.05$)。水解蛋白各组饲料系数的升高可能是由于摄食率的升高从而降低了饲料利用。这与Anders等(2006)用不同分子量的水解蛋白在高植物蛋白饲料中替代鱼粉投喂鳕鱼,低分子水解蛋白组的饲料系数显著高于鱼粉对照组的研究结果相似。

本实验结果表明,替代水解蛋白各组的蛋白质消化率均显著性高于低鱼粉对照组($P < 0.05$)。Rose等(2002)以70%的基础饲料分别添加30%的6种不同种类加工下脚料制备的寡肽饲喂双齿巨脂鲤,结果表明其表观消化率在各实验组之间无显著差异。冯健等(2004)在草鱼饲料中添加0.25%和1.00%的虾肽蛋白,对蛋白质消化率影响显著。在不同研究中表观消化率的差异可能是由不同试验条件如鱼的种类、年龄及可消化蛋白的构成不同所造成的(Lee 2002)。本实验结果与冯健等(2004)的研究结果一致,表明了添加低分子水解蛋白的饲料能提高牙鲆蛋白质的消化吸收率,对蛋白质吸收具有促进作用。

本实验各处理组肝体比无显著性差异($P > 0.05$)(表4),Aksnes等(2006b)的研究结果表明,大分子水解蛋白和较低分子水解蛋白均显著提高了肝体比,这与本实验结果不同,具体原因有待进一步研究。

3.2 水解蛋白对牙鲆血清酸性磷酸酶、碱性磷酸酶、超氧化物歧化酶、溶菌酶、总抗氧化能力酶活力的影响

替代水解蛋白各组的超氧化物歧化酶活力都显著高于低鱼粉负对照组($P < 0.05$),且替代总蛋白11%组

显著性高于高鱼粉正对照组($P < 0.05$)。FPH₆、FPH₁₁、FPH₁₆组的总抗氧化能力显著高于低鱼粉负对照组但显著低于高鱼粉正对照组($P < 0.05$)。超氧化物歧化酶是鱼体在生长发育过程中清除体内氧自由基(如超氧阴离子自由基 $O_2^{\cdot-}$)之类有害物质的主要酶类,保护细胞免受损失,在机体的氧化与抗氧化平衡中起着至关重要的作用(徐奇友等 2007)。总抗氧化能力是用于衡量动物机体内抗氧化系统功能状况的综合性指标。其大小可代表和反映机体抗氧化酶系统和非酶促系统对外来刺激的代偿能力以及机体自由基代谢的状态(张春玲等 2004)。这两个指标大小可以反映出鱼体抗氧化能力的强弱,因此适量的低分子水解蛋白对提高鱼体抗氧化能力有显著作用。许培玉等(2004)发现,在饲料中添加 1%的寡肽制品可显著提高南美白对虾溶菌酶和超氧化物歧化酶(SOD)的活力。

综上所述,在高植物蛋白饲料中用低分子水解蛋白作为牙鲆饲料蛋白源替代鱼粉,当替代总蛋白的 11%组即添加量的 4.5%时显著高于低鱼粉负对照组的特定生长率、摄食率、蛋白沉积率、蛋白质消化率($P < 0.05$),且与高鱼粉正对照组无显著性差异($P > 0.05$);同时替代总蛋白 11%组的超氧化物歧化酶活力显著高于低鱼粉对照组和高鱼粉对照组,总抗氧化能力显著高于低鱼粉对照组但显著低于高鱼粉对照组。

参 考 文 献

- 于 辉,冯 健,刘栋辉,梁桂英. 2004. 酪蛋白小肽对幼龄草鱼生长和饲料利用的影响. 水生生物学报, 28(5): 526~530
- 王碧莲,徐加锐,钱雪桥. 2001. 小肽制品对欧鳗生长特征的影响. 淡水渔业, 31(2): 42~43
- 王建峰,乐国伟. 2006. 小肽在动物营养中的应用. 饲料工业, 27(7): 9~11
- 王佳丽,丁鉴锋. 2003. 饲料中寡肽作为氮源的优势. 中国饲料, (13): 23~24
- 王家林,梁萌青,常 青. 2006. 饲料中蛋白寡聚肽对鲈鱼和小白鼠蛋白消化率和蛋白沉积率的影响. 海洋水产研究, 27(5): 68~73
- 冯 健,高 玲,刘永坚,田丽霞,刘栋辉,梁桂英. 2004. 草鱼日粮中虾蛋白肽对幼龄草鱼生长性能的影响. 中山大学学报(自然科学版), 43(2): 100~103
- 冯 健,王明鹏. 2004. 虾肽诱食剂改善南美白对虾植物蛋白日粮的作用. 海洋科学, 28(4): 48~51
- 甘 晖. 2005. 小肽的营养对幼龄建鲤生长的影响. 饲料工业, 26(22): 30~32
- 施用晖,乐国伟,杨 风. 1996. 不同比例小肽与游离氨基酸对来航公鸡氨基酸吸收的影响. 四川农业大学学报, 14(S1): 37~45
- 江新业. 2008. 利用鱼类下脚料制备水解蛋白粉的研究. 中国食品添加剂, S1: 165~167
- 刘 峰,麦康森,艾庆辉,段青源,徐 玮,谭北平,张文兵,马洪明,刘付志国. 2006. 鱼肉水解蛋白对大黄鱼稚鱼存活、生长以及体组成的影响. 水产学报, 30(4): 502~508
- 刘文斌,王 恬. 2006. 棉粕蛋白酶解物对异育银鲫消化、生长和胰蛋白酶 mRNA 表达量的影响. 海洋与湖沼, 37(6): 568~574
- 许培玉,周洪琪. 2004. 小肽制品对南美白对虾生长及非特异性免疫力的影响. 中国饲料, (17): 13~15
- 陈 勇,曹永辛,王 锋. 1999. 小肽吸收机制及营养作用. 中国饲料, (12): 15~17
- 李 清,肖调义,毛华明. 2005. 小肽对鲤鱼免疫力的影响. 饲料研究, (5): 1~3
- 张春玲,胡俊峰,王丕文,王桂亭,刘国庆,于素芳,韩惠芬. 2004. 苯并(a)芘对鲫鱼肝脏总抗氧化能力的影响. 环境与健康杂志, 21(5): 325~326
- 施用晖,乐国伟,刘选珍,王之盛. 2001. 体外消化过程中蛋白质品质与寡肽释放的研究. 中国畜牧杂志 17(6): 12~14
- 徐奇友,许 红,郑秋珊,马建章. 2007. 牛磺酸对虹鳟仔鱼生长、体成分和免疫指标的影响. 动物营养学报, 19(5): 544~548
- 雷光高,叶继丹,宋奔奔,邹 全,常建波. 2008. 小肽对牙鲆幼鱼的生长、消化酶活性及肝脏抗氧化能力的影响. 水产养殖, 29(3): 1~3
- 黎观红,乐国伟,施用晖. 2004. 动物蛋白质营养中小肽的吸收及其生理作用. 生物学通报, 39(1): 20~21
- Adriana, M., Fernando, L. *et al.* 2003. Effects of dietary protein on the activity and mRNA level of trypsin in the midgut gland of the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Biochemistry and Molecular Biology*, 135(2): 373~383
- Aksnes, A., Hope, B., Høstmark, Ø., and Albrektsen, S. 2006a. Inclusion of size fractionated fish hydrolysate in high plant protein diets for Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Aquaculture*, 261(1): 1102~1110
- Aksnes, A., Hope, B., Jönsson, E., Björnsson, B. T., and Albrektsen, S. 2006b. Size-fractionated fish hydrolysate as feed ingredient for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed high plant protein diets. I: Growth, growth regulation and feed utilization. *Aquaculture*, 261(1): 305~317
- Anggawati, A., Murtini, J., and Heruwati, E. 1990. The use of hydrolyzed protein concentrate in practical diets for *Penaeus monodon* juveniles. *Research Institute for Fish Technology*, 112: 1~12
- Berge, G., and Storebakken, T. 1996. Fish protein hydrolysate in starter diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry. *Aquaculture*, 145(1-4): 205~212

- Clarke, E. I., and Wiseman, J. 2000a. Developments in plant breeding for improved nutritional quality of soya beans: Protein and amino acid content. *J. Agri. Sci. (Cambridge)*, 134(2): 111~124
- Clarke, E. I., and Wiseman, J. 2000b. Developments in plant breeding for improved nutritional quality of soya beans: Anti-nutritional factors. *J. Agri. Sci. (Cambridge)*, 134(2): 125~136
- Cahu, C. L., Zambonino Infante, J. L., Quazuguel, P., and Le Gall, M. M. 1999. Protein hydrolysate vs fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. *Aquaculture*, 171(1-2): 109~119
- Carvalho, A. P., Sá, R., Oliva-Teles, A., and Bergot, P. 2004. Solubility and peptide profile affect the utilization of dietary protein by common carp (*Cyprinus carpio*) during early larval stages. *Aquaculture*, 234(1-4): 319~333
- Espe, M., Sveier, H., Hogoy, I., and Lied, E. 1999. Nutrient absorption and growth of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed fish protein concentrate. *Aquaculture*, 174(1-2): 119~137
- Francis, G., Makker, H. P. S., and Becker, K. 2001. Antinutritional factors present in plant derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture*, 199: 197~227
- Kaushik, S. J., Cravedi, J. P., Lalles, J. P., Sumpter, J., and Laroche, M. 1995. Partial or total replacement of fish meal by soybean protein on growth, protein utilization, potential estrogenic or antigenic effects, cholesterolemia and flesh quality in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 133(3-4): 257~274
- Lee, S. M. 2002. Apparent digestibility coefficients of various feed ingredients for juvenile and grower rockfish (*Sebastes schlegelii*). *Aquaculture*, 207(1-2): 79~95
- Newey, H., and Smyth, D. 1960. Intracellular hydrolysis of dipeptides during intestinal absorption. *Journal of Physiology*, 152(2): 367~380
- Newey, H., and Smyth, D. 1959. The intestinal absorption of some dipeptides. *Physiol.* 145: 48~52
- Rose, M. V., Dalton, J. C., and Elisabete, M. V. 2002. Acid and fermented silage characterization and determination of apparent digestibility coefficient of crude protein for Pacu *Piaractus mesopotamicus*. *The World Aquaculture Society*, 33 (1): 57~62
- Smith, M., and Newey, J. 1960. Amino acid and peptide transport across the Mammalian small intestine. *Protein Metab. Nutr.* 213~219
- Takii, K., Shimeno, S., and Takeda, M. 1986. The effect of feeding stimulants in diet on digestive enzyme activities of eel. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 52(8): 1 449~1 454
- Teshima, S., Kanazawa, A., and Koshio, S. 1993. Recent developments in nutrition and micro-particulate diets of larval prawns. *The Israeli Journal of Aquaculture Bamidgh*, 45(4): 175~184